

组织及血液还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHA3-C48	组织及血液还原性谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒	48T	常量法

产品说明:

谷胱甘肽是由谷氨酸 (Glu)、半胱氨酸 (Cys) 和甘氨酸 (Gly) 组成的天然三肽, 是一种含巯基 (-SH) 的化合物, 广泛存在于动物组织、植物组织、微生物和酵母中。谷胱甘肽能和 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5,5'-dithiobis-2-nitrobenoic acid, DTNB) 反应产生2-硝基-5-巯基苯甲酸和谷胱甘肽二硫化物 (GSSG)。2-硝基-5-巯基苯甲酸为黄色产物, 在波长412nm 处具有最大光吸收。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	粉剂×1支	2-8℃ 保存

操作步骤:

一、样本处理

1. 组织: 按照组织质量 (g): 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆 (匀浆器/研钵提前放冰上预冷)。12000g, 4℃ 离心 10min, 取上清液放置于4℃待测。若暂时不能完成测试可放于-80℃保存 (可保存3 天)。

2. 细菌、细胞: 按照细胞数量 (10^6 个): 试剂一体积 (mL) 为 5~10 : 1 的比例 (建议5 百万细胞加入 1mL 试剂一), 反复冻融2-3 次 (可在液氮中冻结、37℃水浴中溶解) 或者冰浴超声波破碎细胞 (功率200w, 超声3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 12000g, 4℃离心 10 分钟, 取上清置于冰上待测。若暂时不能完成测试可放于-80℃ 保存 (可保存3 天)。

3. 血液处理

血浆: 将收集的抗凝血于4℃, 600g 离心 10 分钟, 吸取上层血浆到另一支试管中, 加入等体积的试剂一, 沸水浴 5min (缠封口膜, 防止爆盖)。之后 12000g, 4℃离心 10 分

钟，将上清移入新的试管中放置于4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存3天）。

血细胞：将收集的抗凝血于4℃，600g离心10分钟，弃去上层血浆用3倍体积的PBS清洗3次（用PBS重悬血细胞，600g离心10分钟），加入等体积试剂一，沸水浴5min（缠封口膜，防止爆盖）。之后12000g，4℃离心10分钟，吸取上清放于4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存3天）。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min以上，调节波长至412nm，蒸馏水调零。

2、标准品的准备：吸取10mg/mL标准溶液，用蒸馏水稀释至200μg/mL、100μg/mL、50μg/mL、25μg/mL、12.5μg/mL。

3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度(μg/mL)	标准液体积(μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度(μg/mL)
1	10000(即10mg/mL)	20	980	200
2	200	500	500	100
3	100	500	500	50
4	50	500	500	25
5	25	500	500	12.5

备注：下述实验中每个标准管需100μL标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	100	-	-
标准品	-	100	-
蒸馏水	-	-	100
试剂二	700	700	700
试剂三	200	200	200

混匀后常温静置2min后分别检测测定管、标准管和空白管在412nm处的吸光度，分别记为A_{测定}、A_{标准}和A_{空白}，计算 $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。标准曲线和空白管只需做1-2次。

4、加样表：在1.5mL EP管中分别加入下列试剂

三、GSH含量计算

1. 标准曲线的绘制

据标准管的浓度(x, μg/mL)和吸光度 $\Delta A_{标准}$ (y, $\Delta A_{标准}$)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{测定}$ (y, $\Delta A_{测定}$)带入公式计算样本浓度(x, μg/mL)。

2. GSH含量计算：

(1) 按蛋白浓计算

$$\text{GSH 含量}(\mu\text{g}/\text{mg prot}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = x \div C_{\text{pr}}$$

$$\text{GSH 含量}(\mu\text{g}/\text{g 质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = x \div W$$

(3) 按细胞/细菌数量计算

$\text{GSH 含量}(\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) = x \div N$ (4) 按血浆
(血细胞) 体积计算

$\text{GSH 含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) = 2x$

V 样总: 上清液总体积, 1mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 100 μL =0.1mL; W : 样本质量, g; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; N: 细胞/细菌数量, 以 10^6 为单位计量; 2: 稀释倍数, 血浆(血细胞) 体积被稀释 一倍。

注意事项:

- 1、若不确定样本中GSH 含量的高低, 可稀释几个梯度后再进行测量。
- 2、因为试剂一中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量, 需另取组织。
- 3、如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。